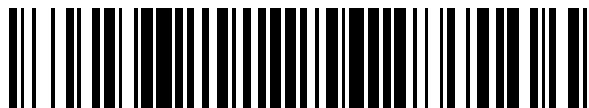


19

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 453 205**

21 Número de solicitud: 201231370

51 Int. Cl.:

A61K 9/51 (2006.01)**A61K 47/26** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

04.09.2012

43 Fecha de publicación de la solicitud:

04.04.2014

Fecha de la concesión:

06.03.2015

45 Fecha de publicación de la concesión:

13.03.2015

56 Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2013/070581

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALÈNCIA
(50.0%)****Ctro. Apoyo a la Innovación, la Investigación y la
Transferencia de Tecnología CTT, Edf. 6 G,
Camino de Vera, s/n
46022 VALENCIA (Valencia) ES;
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS(CSIC) (27.5%);
CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA EN
RED EN BIOINGENIERÍA, BIOMATERIALES Y
NANOMEDICINA (CIBER-BBN) (5.0%);
CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA EN
RED DE ENFERMEDADES RARAS (CIBERER)
(5.0%) y
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID (12.5%)**

72 Inventor/es:

**MARTÍNEZ MÁÑEZ, Ramón;
MURGUIA IBÁÑEZ, José Ramón;
PERONA ABELLÓN, Rosario;
AGOSTINI, Alessandro;
MONDRAGÓN MARTÍNEZ, Laura;
MORENO TORRES, Marta;
MANGUAN GARCÍA, Cristina;
MARCOS MARTÍNEZ, María Dolores;
SOTO CAMINO, Juan y
SANCENÓN GALARZA, Felix**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel54 Título: **LIBERACIÓN DE SUSTANCIAS EN CÉLULAS SENESCENTES**

57 Resumen:

Liberación de sustancias en células senescentes.
La invención trata de nanodispositivos para la liberación controlada de sustancias que comprenden un soporte recubierto por oligosacáridos, donde dichos oligosacáridos comprenden al menos 3 unidades de monosacáridos, y donde al menos uno de los monosacáridos es galactosa. Estos nanodispositivos liberan su carga de manera específica en células senescentes. La invención también recoge su procedimiento de obtención y sus usos.

ES 2 453 205 B1

LIBERACIÓN DE SUSTANCIAS EN CÉLULAS SENESCENTES**DESCRIPCIÓN**

5 La presente invención se refiere a nanodispositivos para la liberación controlada de fármacos, biofármacos y cosméticos. Por tanto, la invención se podría encuadrar en el campo de las industrias farmacéutica y cosmética.

ESTADO DE LA TÉCNICA

10 Las células somáticas normales invariablemente entran en un estado de crecimiento irreversiblemente detenido y de funciones alteradas después de un número finito de divisiones, llamado senescencia celular. Las células senescentes muestran un fenotipo radicalmente alterado que se cree que perjudica la función de los tejidos y los predispone al desarrollo y al progreso de enfermedades. Pese a que el sistema inmunológico destruye muchas células senescentes, se vuelve mucho menos efectivo en esta tarea con el envejecimiento. Como consecuencia, células senescentes o "resistentes a la muerte" se acumulan en los tejidos, acelerando así el envejecimiento y el desarrollo de enfermedades. Además la acumulación de células senescentes altera el comportamiento de las células vecinas, favorece la degradación de la matriz extracelular, disminuye la fuente de células capaces de sufrir mitosis y estimula el cáncer.

20 Hay un gran número de patologías asociadas al envejecimiento celular acelerado tales como síndrome Werner de progeria adulta (WS), Hutchinson-Gilford (HGS) y síndrome Rothmund Thompson (RTS). En WS o RTS se observa erosión de los telómeros en la mayoría de los tejidos, incluso si telomerasa no es la causa principal de la enfermedad. Otras enfermedades están más relacionadas con envejecimiento acelerado en tejidos específicos tales como la Diskeratosi Congénita (DC) o la Fibrosis pulmonar idiopática (IPF). En estas condiciones, la capacidad replicativa de las células está dañada debido a una actividad defectuosa de la telomerasa en el compartimiento de las células madres de tejidos con alta regeneración celular tales como la piel, el epitelio pulmonar y la médula ósea. Un efecto secundario frecuente en estas enfermedades es la inducción de cáncer, especialmente de esos cánceres que implican un acortamiento de los telómeros. Para combatir este problema son fundamentales estrategias para prevenir, reemplazar o eliminar células senescentes. En particular, el diseño de estas terapias contribuiría al tratamiento del envejecimiento celular acelerado y podría estimular la idea de que el rejuvenecimiento es posible.

35 Una primera aproximación para conseguir el objetivo de eliminar células senescentes estaría relacionada con el desarrollo de sistemas de distribución selectiva capaces de liberar su carga en estas células particulares.

40 Los sistemas de liberación tradicional se basan en polímeros que normalmente no responden a estímulos sino que van liberando su carga por procesos controlados por difusión y por degradación de un contenedor polimérico. Por otro lado, la nanotecnología ha demostrado ser una aproximación innovadora en terapias. Los sistemas de liberación de fármacos capaces de liberar moléculas activas en ciertas células de una manera controlada han tenido mucha atención recientemente, como las microcápsulas poliméricas, dendrímeros, micelas y nanopartículas. Alternativamente, nanopartículas de sílice mesoporosa (MSN) se han usado ampliamente en los últimos años como reservas para el almacenamiento de drogas debido a su estructura mesoporosa única, gran volumen específico y fácil funcionalización. Además MSN son biocompatibles, no tóxicas y se ha descrito su captación celular vía endocitosis.

50 Recientemente, se han descrito nanopartículas de sílice mesoporosa recubiertas de lactosa para la liberación controlada de fármacos en presencia de β -galactosidasa, hallada en el cuerpo humano en especial en los enterocitos del villi del intestino delgado (A. Bernardos y otros, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, 48, 5884-5887). Sin embargo, la liberación de la carga en el sistema descrito no sería muy selectiva in vivo, ya que con la hidrólisis de un solo enlace β (1 \rightarrow 4) sería suficiente para liberar parcialmente la carga. Por ello, un sistema de esta clase tendría escasa selectividad, ya que células con una expresión normal del enzima provocarían la liberación. Además, la liberación de la carga sería rápida, impidiendo su reparto por la totalidad del tejido a tratar.

60 Dada la urgente necesidad de desarrollar nuevas maneras terapéuticas de prevenir la aparición de insuficiencias y enfermedades humanas relacionadas con la senescencia se siguen necesitando sistemas para el tratamiento selectivo de células senescentes.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere a nanopartículas de un material mesoporoso para la liberación controlada de sustancias en células senescentes. La liberación de la carga se activa por la presencia de β -galactosidasa asociada a la senescencia (SA- β -gal) en células senescentes. La existencia de esta SA- β -gal en estas células se explica por la sobreexpresión de β -galactosidasa liposomal endógena que ocurre específicamente en células senescentes.

10 La presente invención presenta las siguientes ventajas:

- proporciona una liberación más específica y controlada
- la liberación se produce selectivamente en células que sobreexpresan β -galactosidasa, como las células senescentes,
- 15 - las nanopartículas son introducidas en las células preferentemente por vía lisosomal, por lo que van directamente a la región celular con la máxima expresión de β -galactosidasa.

20 Un primer aspecto de la presente invención se refiere a un nanodispositivo para la liberación controlada de sustancias que comprende un soporte mesoporoso recubierto por oligosacáridos, donde dichos oligosacáridos comprenden al menos 3 unidades de monosacáridos, y donde al menos uno de los monosacáridos es galactosa.

25 Un segundo aspecto de la presente invención se refiere al procedimiento de obtención del nanodispositivo tal y como se ha descrito anteriormente que comprende las etapas de:

- a) funcionalizar el oligosacáridos con un grupo silano
- b) suspender el soporte en una disolución de la sustancia a liberar
- 30 c) añadir a la suspensión anterior un exceso del oligosacárido funcionalizado de la etapa (a).

35 Un tercer aspecto de la presente invención se refiere a una composición que comprende nanodispositivos tal y como se han descrito anteriormente.

Un cuarto aspecto de la presente invención se refiere al uso del nanodispositivo tal y como se ha descrito anteriormente, para la elaboración de un medicamento.

40 Un quinto aspecto de la presente invención se refiere al uso del nanodispositivo tal y como se ha descrito anteriormente para la elaboración de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades que cursen con la sobreexpresión de β -galactosidasa.

45 Un sexto aspecto de la presente invención, se refiere al uso del nanodispositivo tal y como se han descrito anteriormente para la fabricación de una composición cosmética.

Un séptimo aspecto de la presente invención, se refiere al uso del nanodispositivo tal y como se ha descrito anteriormente para la fabricación de un equipo para la detección y cuantificación de células senescentes.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

55 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención.

60 Un primer aspecto de la presente invención se refiere a un nanodispositivo para la liberación controlada de sustancias que comprende un soporte recubierto por oligosacáridos, donde dichos oligosacáridos comprenden al menos 3 unidades de monosacáridos, y donde al menos un 20% de los monosacáridos son galactosa. Preferiblemente el nanodispositivo comprende de 3 a 10 unidades de monosacáridos y aún más preferiblemente de 3 a 6 unidades de monosacáridos.

Por el término "nanodispositivo" se entiende en el contexto de la invención a un dispositivo de tamaño nanométrico capaz de liberar fármacos o cosméticos selectivamente.

5 Por el término "oligosacárido" se entiende un carbohidrato que consiste en 3 a 15 unidades de monosacáridos (unidades básicas de los azúcares, generalmente con la fórmula general $C_nH_{2n}O_n$).

10 Además, en una realización preferida del primer aspecto de la presente invención, al menos un 50% de los monosacáridos son galactosa. Que al menos un 50% de los monosacáridos sean galactosa quiere decir que si hay 3 monosacáridos, 2 o 3 de ellos serán galactosa; si hay 4, 2, 3 o 4 de ellos serán galactosa; si hay 5, 3, 4 o 5 serán galactosa y si hay 6 monosacáridos, 3, 4, 5 o 6 de ellos serán galactosa. Preferiblemente todos los monosacáridos son galactosa.

15 Los nanodispositivos de la invención pueden tener un diámetro de 10 nm a 250 nm, preferiblemente de 25 nm a 150 nm.

En otra realización preferida del primer aspecto de la presente invención, el soporte es un material mesoporoso, preferiblemente sílice mesoporosa.

20 Por "soporte mesoporoso" se entiende un soporte que comprende poros con un diámetro entre 0,01 nm y 50 nm. De la misma manera, por sílice mesoporosa se entiende una sílice con poros del diámetro indicado.

25 Este soporte mesoporoso preferiblemente tiene un diámetro de poro es de 0,5 nm a 10 nm, preferiblemente de 1,5 nm a 3,5 nm.

30 En otra realización preferida del primer aspecto de la presente invención, el nanodispositivo además comprende la sustancia a liberar. Esta sustancia a liberar se puede seleccionar de la lista que comprende indicadores, compuestos para la reactivación de la telomerasa, compuestos citotóxicos y cualquiera de sus mezclas.

35 Por indicador (o marcador) se entiende una molécula que cuando se libera marca a la célula de alguna manera que permita su detección y/o cuantificación. Estos indicadores no tienen efectos significativos en la viabilidad de las células. Un ejemplo de indicador serían las sustancias fluorescentes como la rodamina-B, $Ru(Bipy)_3^{2+}$, safranina y fluoresceína.

40 Compuesto para la reactivación de la telomerasa quiere decir aquella molécula o biomolécula que suministrada a una célula, produce un incremento de la actividad telomerasa, traduciéndose en un aumento de la longitud de los telómeros y/o un mantenimiento del tamaño de los mismos. Como consecuencia la viabilidad celular aumenta. Dicho efecto puede conseguirse de forma directa, modulando la actividad catalítica de la telomerasa, o bien de forma indirecta aumentando los niveles de telomerasa. Ejemplos de compuestos para la reactivación de la telomerasa válidos en el campo de la invención serían el péptido GSE 24-2, y las moléculas TAT2 (cycloastragenol), TA-65 y GRN510.

45 Compuestos citotóxicos quiere decir compuestos que son tóxicos para las células. En contacto con compuestos citotóxicos, las células pueden sufrir necrosis, apoptosis o pueden dejar de crecer y dividirse. Ejemplos de compuestos citotóxicos válidos en el contexto de la invención serían agentes intercalantes (entre otros cisplatino, oxaliplatino o carboplatin), antagonistas nucleótidos/inhibidores de la maquinaria de replicación (entre otros doxorubicina, camptotecina, etoposido, 5-fluorouracilo, gemcitabina, citosina, arabinosido o 6-mercaptopurina), inhibidores del huso acromático (entre otros taxanos, vincristina, vinblastina o adriamicina) o inhibidores de la síntesis de folato (entre otros metotrexato o pemetrexed).

50 Preferiblemente, la sustancia a liberar se selecciona de la lista que comprende el péptido GSE 24-2, el péptido TAT2 (cycloastragenol), cisplatino, oxaliplatino, carboplatin, doxorubicina, camptotecina, etoposido, 5-fluorouracilo, gemcitabina, citosina, arabinosido, 6-mercaptopurina, taxanos, vincristina, vinblastina, adriamicina metotrexato, pemetrexed y cualquiera de sus mezclas.

55 Estas sustancias, liberadas selectivamente pueden prevenir y eliminar/reemplazar o detectar y marcar células senescentes. Las células senescentes presentan de manera específica una sobreexpresión de β -galactosidasa liposomal endógena. Esta β -galactosidasa es capaz de hidrolizar los oligosacáridos que recubren el soporte, liberando así la carga.

60 En otra realización preferida del primer aspecto de la presente invención, la proporción de la sustancia a liberarse es de 0,01 a 0,50 g por g de soporte.

Un segundo aspecto de la presente invención se refiere al procedimiento de obtención del nanodispositivo tal y como se ha descrito anteriormente que comprende las etapas de:

- 5 a) funcionalizar el oligosacáridos con un grupo silano
- b) suspender el soporte en una disolución de la sustancia a liberar
- 10 c) añadir a la suspensión anterior un exceso del oligosacárido funcionalizado de la etapa (a).

Por funcionalizar el oligosacáridos con un grupo silano se entiende hacer reaccionar uno de los dos extremos, preferiblemente el extremo que contiene un carbono anomérico con un grupo funcional silano, que permite el anclaje de la cadena de oligosacáridos al soporte, que es preferiblemente sílice.

15 Preferiblemente, la etapa (b) se deja en agitación de 1 a 48 horas, preferiblemente de 10 a 30 horas. El soporte mesoporoso puede ser obtenido comercialmente o puede ser preparado antes de su uso. Normalmente para sintetizar un material como MCM-41 se emplea una mezcla de n-cetilmetilamonibromuro y NaOH, en la que se añade gota a gota tetraetil ortosilicato (TEOS). Una vez lavado y secado, el sólido obtenido se calcina en atmósfera oxidante para eliminar la fase plantilla.

20 En una realización preferida del segundo aspecto de la presente invención la etapa (b) se lleva a cabo en disolventes polares, preferiblemente el disolvente se selecciona del grupo que comprende metanol, etanol, propanol, isopropanol, acetona y acetonitrilo. Excelentes resultados se han obtenido cuando el disolvente es etanol.

25 Una vez saturado el soporte con la sustancia a liberar, se puede proceder a recubrir con el oligosacáridos funcionalizado. Preferiblemente la proporción de oligosacárido funcionalizado / soporte es de 1 a 5 veces en masa (es decir, que por cada gramo de soporte hay entre 1 y 5 gramos de polisacárido funcionalizado) Esta etapa (c) se deja en agitación preferiblemente de 0,5 a 20 horas, más preferiblemente de 1 a 10 horas.

30 Un tercer aspecto de la presente invención se refiere a una composición que comprende nanodispositivos tal y como se han descrito anteriormente. La composición, definida de forma general, es un conjunto de componentes que está formado al menos por el producto tal y como se describe en la invención.

35 En una realización preferida del tercer aspecto de la presente invención, la composición es farmacéutica. Esta composición farmacéutica preferiblemente comprende excipientes farmacéuticamente aceptables. La composición farmacéutica es un conjunto de componentes que está formado al menos por el producto de la invención (el nanodispositivos junto con la sustancia a liberar) en cualquier concentración, que tiene al menos una aplicación en la mejora del bienestar físico o fisiológico o psicológico de un sujeto, que implique una mejora del estado general de su salud.

40 Para su aplicación en terapia, el producto de la invención se encontrará, preferentemente, en una forma farmacéuticamente aceptable o sustancialmente pura, es decir, que tiene un nivel de pureza farmacéuticamente aceptable excluyendo los aditivos farmacéuticos normales tales como diluyentes y portadores, y no incluyendo material considerado tóxico a niveles de dosificación normales. Los niveles de pureza para el principio activo son preferiblemente superiores al 50%, más preferiblemente superiores al 70%, y todavía más preferiblemente superiores al 90%. En una realización preferida, son superiores al 95% del compuesto anteriormente descrito, o de sus sales, solvatos o profármacos.

45 En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a aquella cantidad del componente de la composición farmacéutica que cuando se administra a un mamífero, con preferencia un humano, es suficiente para producir la prevención y/o el tratamiento, tal como se define más adelante, de una enfermedad o condición patológica de interés en el mamífero, con preferencia un humano. La cantidad terapéuticamente efectiva variará, por ejemplo, según la edad, el peso corporal, el estado general de salud, el sexo y la dieta del paciente; el modo y el tiempo de administración; la velocidad de excreción, la combinación de fármacos; la gravedad del trastorno o la condición patológica particulares; y el sujeto sometido a terapia, pero puede ser determinada por un especialista en la técnica según su propio conocimiento.

50 El término medicamento tiene un significado más limitado que el significado de "composición farmacéutica", tal como se define en la presente invención, ya que el medicamento implica necesariamente un efecto preventivo o terapéutico es decir, un efecto fisiológico en el sujeto.

- El término “excipiente” hace referencia a una sustancia que ayuda a la absorción de cualquiera de los componentes del producto de la invención, estabiliza dichos componentes o ayuda a la preparación de la composición farmacéutica en el sentido de darle consistencia o aportar sabores que lo hagan más agradable. Así pues, los excipientes podrían tener la función de mantener los componentes unidos como por ejemplo almidones, azúcares o celulosas, función de endulzar, función de colorante, función de protección del medicamento como por ejemplo para aislarlo del aire y/o la humedad, función de relleno de una pastilla, cápsula o cualquier otra forma de presentación como por ejemplo el fosfato de calcio dibásico, función desintegradora para facilitar la disolución de los componentes y su absorción en el intestino, sin excluir otro tipo de excipientes no mencionados en este párrafo. Por tanto, el término “excipiente” se define como aquella materia que, incluida en las formas galénicas, se añade a los principios activos o a sus asociaciones para posibilitar su preparación y estabilidad, modificar sus propiedades organolépticas o determinar las propiedades físico-químicas de la composición farmacéutica y su biodisponibilidad. El excipiente “farmacéuticamente aceptable” debe permitir la actividad de los compuestos de la composición farmacéutica, es decir, que sea compatible con dichos componentes. Ejemplos de excipientes son aglutinantes, rellenos, desintegradores, lubricantes, recubridores, endulzantes, saborizantes y colorizantes. Ejemplos más concretos no limitantes de excipientes aceptables son almidones, azúcares, xilitol, sorbitol, fosfato de calcio, grasas esteroideas, talco, sílice o glicerina entre otros.
- La “forma galénica o forma farmacéutica” es la disposición a que se adaptan los principios activos y excipientes para constituir un medicamento. Se define por la combinación de la forma en la que la composición farmacéutica es presentada por el fabricante y la forma en la que es administrada.
- La composición farmacéutica puede comprender un “vehículo” o portador, que es preferiblemente una sustancia inerte. La función del vehículo es facilitar la incorporación de otros compuestos, permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma a la composición farmacéutica. Por tanto, el vehículo es una sustancia que se emplea para diluir cualquiera de los componentes de la composición farmacéutica de la presente invención hasta un volumen o peso determinado; o bien que aún sin diluir dichos componentes es capaz de permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma al medicamento. Es vehículo es farmacéuticamente aceptable. Cuando la forma de presentación es líquida, el vehículo farmacéuticamente aceptable es el diluyente.
- Además, el excipiente y el vehículo deben ser farmacológicamente aceptables, es decir, que el excipiente y el vehículo esté permitido y evaluado de modo que no cause daño a los organismos a los que se administra.
- La composición farmacéutica de la invención puede comprender otra sustancia activa. Además del requerimiento de la eficacia terapéutica, donde dicha composición farmacéutica puede necesitar el uso de otros agentes terapéuticos, pueden existir razones fundamentales adicionales que obligan o recomiendan en gran medida el uso de una combinación de un compuesto de la invención y otro agente terapéutico. El término “principio activo” es toda materia, cualquiera que sea su origen, humano, animal, vegetal, químico o de otro tipo, a la que se atribuye una actividad apropiada para constituir un medicamento.
- En cada caso la forma de presentación del medicamento se adaptará al tipo de administración utilizada, por ello, la composición de la presente invención se puede presentar bajo la forma de soluciones o cualquier otra forma de administración clínicamente permitida y en una cantidad terapéuticamente efectiva. La composición farmacéutica de la invención se puede formular en formas sólidas, semisólidas, líquidas o gaseosas, tales como comprimido, cápsula, polvo, gránulo, ungüento, solución, supositorio, inyectable, inhalante, gel, jarabe, nebulizador, microesfera o aerosol, preferiblemente en forma de comprimido, cápsula, polvo, gránulo, solución, supositorio o jarabe.
- Las composiciones anteriormente mencionadas pueden ser preparadas usando métodos convencionales, como los descritos en las Farmacopeas de diferentes países y en otros textos de referencia.
- Los compuestos y composiciones de la presente invención pueden ser empleados junto con otros medicamentos en terapias combinadas. Los otros fármacos pueden formar parte de la misma composición o de otra composición diferente, para su administración al mismo tiempo o en tiempos diferentes.
- En una realización del tercer aspecto de la presente invención, la composición es cosmética.

En la presente invención se entiende como "cosmético" a aquellas preparaciones constituidas por sustancias naturales o sintéticas o sus mezclas, de uso externo en las diversas partes del cuerpo humano: piel, sistema capilar, uñas, labios, órganos genitales externos, dientes y membranas mucosas de la cavidad oral, con el objeto exclusivo o principal de higienizarlas, perfumarlas, cambiarles su apariencia, protegerlos o mantenerlos en buen estado y/o corregir olores corporales pero no para producir un efecto terapéutico. La composición cosmética puede contener excipientes y/o vehículos farmacéuticamente y farmacológicamente aceptables tal como se ha descrito en párrafos anteriores. Por otra parte la composición cosmética puede presentarse en cualquier forma adaptada a la administración tópica, preferiblemente en forma de crema, loción, gel o polvo.

Un cuarto aspecto de la presente invención se refiere al uso del nanodispositivo tal y como se ha descrito anteriormente, para la elaboración de un medicamento.

El medicamento al que se refiere la presente invención puede ser de uso humano o veterinario. El "medicamento de uso humano" es toda sustancia o combinación de sustancias que se presente como poseedora de propiedades para el tratamiento o prevención de enfermedades en seres humanos o que pueda usarse en seres humanos o administrarse a seres humanos con el fin de restaurar, corregir o modificar las funciones fisiológicas ejerciendo una acción farmacológica, inmunológica o metabólica, o de establecer un diagnóstico médico. El "medicamento de uso veterinario" es toda sustancia o combinación de sustancias que se presente como poseedora de propiedades curativas o preventivas con respecto a las enfermedades animales o que pueda administrarse al animal con el fin de restablecer, corregir o modificar sus funciones fisiológicas ejerciendo una acción farmacológica, inmunológica o metabólica, o de establecer un diagnóstico veterinario. También se considerarán "medicamentos veterinarios" las "premezclas para piensos medicamentosos" elaboradas para ser incorporadas a un pienso.

Un quinto aspecto de la presente invención se refiere al uso del nanodispositivo tal y como se ha descrito anteriormente para la elaboración de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades que cursen con la sobreexpresión de β -galactosidasa, preferiblemente esta sobreexpresión tiene lugar en células senescentes. Preferiblemente, la enfermedad se selecciona de la lista que comprende el síndrome Wiedemann-Rautenstrauch de progeria neonatal, el síndrome Werner de progeria adulta, el síndrome Hutchinson-Gilford, el síndrome Rothmund Thompson, el síndrome Mulvill-Smith, el síndrome de Cockayne, la Diskeratosis Congénita, la fibrosis pulmonar idiopática, la anemia aplásica, el enfisema, la diabetes tipo 2, y la degeneración de cartílagos.

Un sexto aspecto de la presente invención, se refiere al uso del nanodispositivo tal y como se han descrito anteriormente para la fabricación de una composición cosmética.

Un séptimo aspecto de la presente invención, se refiere al uso del nanodispositivo tal y como se ha descrito anteriormente para la fabricación de un equipo para la detección y cuantificación de células senescentes. Cuando la sustancia a liberar es un indicador, las células senescentes quedarán marcadas para su detección y/o cuantificación. De esta manera, se puede evaluar el grado de envejecimiento y/o de degeneración tisular.

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la liberación selectiva de sustancias en células senescentes. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIG. 1. Síntesis del derivado galactooligosacárido (I).

FIG. 2. Difractograma de Rayos X de la sílice mesoporosa e imágenes de Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) de los nanodispositivos de la invención cargados con Rodamina-B (S1) y soporte MCM-41 calcinado; I: Intensidad, 2θ : 2θ grados, S1: nanodispositivos cargados con Rodamina recubiertos con galactooligosacáridos (I), MCM-41 c: nanopartículas mesoporosas de sílice calcinadas, MCM-41 m: nanopartículas mesoporosas de sílice sin calcinar, nm: nanómetros.

FIG. 3. Esquema de liberación de la Rodamina-B en presencia de β -gal; B: Rodamina B; G: galactooligosacárido.

FIG. 4. Perfiles de liberación de Rodamina-B de S1 en ausencia y en presencia de enzima β -gal en agua a pH 7,5 y a temperatura ambiente; P: presencia de β -gal; A: ausencia de β -gal; A.U.: Intensidad de la fluorescencia en %; T: tiempo (horas).

FIG. 5. % Viabilidad de células en presencia de las nanopartículas de la invención. A: % Viabilidad de las células de la levadura en presencia de las cantidades indicadas de S1; B: % Viabilidad de las células H460 tras 48 horas de tratamiento con las cantidades indicadas de S1; %V: % Viabilidad.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Síntesis del derivado silano del oligosacáridos.

El galactooligosacárido (I) (fig. 1, $n = 3-6$) se obtuvo como un sirope con un pH de 3,8. Este sirope se diluyó en agua y el pH se aumentó hasta 7 con NaHCO_3 . A continuación la disolución se liofilizó obteniendo un sólido blanco. Después, 5 gramos del sólido se disolvieron en 100 ml de etanol anhidro, y una disolución de 3-aminopropiltietoxisilano (2, 5,85 ml, 25 mmol) se añadió. La mezcla de reacción se agitó durante 24 h a temperatura ambiente. El disolvente se evaporó bajo presión reducida para obtener un sólido blanco (I). Fig. 1.

^1H NMR (300 MHz, D_2O): 0,42 (t, 2H, $-\text{CH}_2-\text{Si}-$), 1,02 (t, 9 H, $\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{O}-\text{Si}-$), 1,53 (m, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{Si}-$), 2,74 (t, 2H, $\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{Si}-$), 3,20-3,77 (m, nH, galactooligosacárido, $\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{O}-\text{Si}-$), 5,13 (d, 1 H, $-\text{O}-\text{CH}-\text{O}-$) ppm, ^{13}C NMR (300 MHz, D_2O): 9,62 ($-\text{CH}_2-\text{Si}-$), 16,65 ($\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{O}-\text{Si}-$), 21,74 ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{Si}-$), 41,96 ($-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{Si}-$), 57,25 ($\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{O}-\text{Si}-$), 61,84 ($\text{HO}-\text{CH}_2-\text{CH}-$), 72,67-78,11 ($\text{HO}-\text{CH}-$), 89,57 ($-\text{O}-\text{CH}-\text{CH}-$), 94,84 ($-\text{O}-\text{CH}-\text{NH}-$), 100,25 ($-\text{O}-\text{CH}-\text{O}-$) ppm.

Ejemplo 2. Síntesis del soporte mesoporoso.

El soporte mesoporoso que se utilizó era sílice mesoporosa, concretamente MCM-41.

N-cetiltrimetilamonibromuro (CTABr, 2,00 g, 5,48 mmol) se disolvieron en 960 ml de agua desionizada. NaOH (ac) (2,00 M, 7,00 ml) se añadió a la disolución de CTABr. Seguidamente se ajustó la temperatura a 95°C. Tetraetil ortosilicato (TEOS, 10,00 ml, $5,14 \times 10^{-2}$ mol) se añadió gota a gota a la disolución anterior. La mezcla se dejó en agitación durante 2,5 h y se obtuvo un precipitado blanco. El producto sólido se centrifugó y se lavó con agua desionizada hasta pH neutro y se secó a 60°C durante 13h. Para preparar el producto poroso final MCM-41, el producto sólido seco se calcinó a 550°C bajo atmósfera oxidante durante 5 h para eliminar el tensoactivo, también llamado agente director de estructura.

El difractograma de rayos X (XRD) del material MCM-41 (fig. 2) muestra cuatro reflexiones de ángulo pequeño típicas de la geometría hexagonal que pueden ser indexadas como picos de Bragg (100), (110), (200) y (210). Se pueden apreciar claramente un desplazamiento significativo de la reflexión (100) y un ensanchamiento de los picos (110) y (200) en el XRD en polvo de la muestra de MCM-41 calcinada. Esto corresponde a una contracción de celda unidad de alrededor de 6-8 Å debida a la condensación de silanoles durante la etapa de calcinación. A pesar de esta clara pérdida parcial de orden, la observación de las reflexiones (100) y (200) indica que cierta relativa simetría mesoporosa se preserva después de la calcinación. Las isoterma de adsorción-desorción de N_2 de las nanopartículas mesoporosas muestra una curva tipo IV típica con una superficie específica de $999,6 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$, y un volumen de poro de $1,17 \text{ cm}^3\text{g}^{-1}$. A partir de XRD, porosimetría y estudios de Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) se calcularon el parámetro a_0 de la celda hexagonal (4,43 nm), el diámetro de poro (2,45 nm) y el valor del grosor de pared (1,98 nm).

Ejemplo 3. Síntesis de los nanodispositivos de la invención cargados con Rodamina-B (sustancia fluorescente).

50 mg de MCM-41 y 19 mg de Rodamina-B (0,04 mmol) se suspendieron en 10 ml de etanol en un matraz de fondo redondo bajo atmósfera inerte. La mezcla se dejó en agitación durante 24 h a temperatura ambiente con el objetivo de conseguir la carga máxima en los poros de MCM-41. Entonces, un exceso de (I), derivado silano del galactooligosacárido, (100 mg en 10 ml de etanol) se añadieron y la mezcla final se dejó en agitación durante 5,5 h a temperatura ambiente. Finalmente, los nanodispositivos de la invención cargados con Rodamina-B (S1) se filtraron y se lavaron con agua.

Las reflexiones (110) y (200) se perdieron parcialmente, seguramente por la una reducción del contraste debida al que el espacio vacío de los poros se llene con la Rodamina-B. Además, la preservación de la estructura mesoporosa en los sólidos funcionalizados finales se confirmó mediante TEM.

Para la determinación del contenido de Rodamina-B en el material híbrido final, 30 mg de **S1** se suspendieron en 75 ml de agua a pH 7,5 en la presencia de 7500 ppm de β -galactosidasa. La mezcla se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 72 h para conseguir la completa liberación de la Rodamina-B. Después la suspensión se centrifugó y el sobrenadante se aisló y secó bajo presión reducida. El crudo obtenido se disolvió en acetona y se filtró. La solución obtenida se secó y el residuo se disolvió en 4 ml de etanol. El contenido final de Rodamina-B se determinó mediante una curva de calibrado basada en el aumento de la banda de absorción centrada en 550 nm con la concentración, obteniéndose 0,14 g/gSiO₂ en peso.

El contenido del galactooligosacárido (**I**) en **S1** se calculó por análisis termogravimétrico, 0,28 g/gSiO₂ en peso.

Ejemplo 4. Estudios de la liberación de carga.

10 mg de **S1** se suspendieron en 18,75 ml de agua a pH 7,5 y entonces se añadieron 6,25 ml de una solución de enzima lactozima (β -D-galactosidasa) (0,3 g de enzima en 10 ml de agua a pH 7,5). La liberación de la Rodamina-B de los poros a la solución acuosa se monitorizó por la banda de emisión de la Rodamina-B centrada en 580 nm.

Ejemplo 5. Experimentos de liberación de carga en *S. cerevisiae*.

Cepas y condiciones de cultivo

Todas las cepas de levadura usadas en este estudio tienen la base genética de BY4741 (MAT α leu2 Δ 0, his3 Δ 0, met15 Δ 0, ura3 Δ 0). La cepa β -Gal^{oe} se generó transformando la cepa WT BY4741 con el vector de expresión β -gal p477 (URA3). Se utilizaron métodos estándar para el cultivo y manipulación de las levaduras. El medio mínimo (SD) contenía 2% de glucosa, 0,67% de base de nitrógeno de levadura y los suplementos de amino ácidos apropiados para mantener la selección de URA3. Los cultivos de levadura se mantuvieron a 30°C.

Microscopía de fluorescencia y estudios de viabilidad celular

Las levaduras BY4741(WT, *wild type*) y β -Gal^{oe} se cultivaron en medio SD durante la noche a 28°C en agitación continua en una densidad de 10⁸ células/ml. Entonces, alícuotas de 1 ml de esta suspensión se centrifugaron y se resuspendieron en 100 μ l de medio SD a pH 3,7 conteniendo 5 mg/ml de nanopartículas **S1** cargadas con Rodamina-B y se incubaron por 6 h a 40°C. La liberación intracelular se monitorizó por microscopía fluorescente usando un microscopio NIKON ECLIPSE 600 equipado con una lámpara fluorescente NIKON Y-FL, λ_{ex} = 540 nm, λ_{em} = 650 nm. Después del periodo de incubación, aproximadamente 300 células se sembraron en una placa YPD y se incubaron durante 72 h. Finalmente, la formación de colonias se cuantificó y se calculó la viabilidad celular. Los experimentos se repitieron dos veces conteniendo triplicados. Los datos se expresan como (media \pm D.E., desviación estándar). La incubación con las nanopartículas **S1** no afectó a la viabilidad celular a lo largo del experimento (tabla 1, fig. 5 A)

Tabla 1. % Viabilidad de la levadura β -Gal^{oe} incubada con **S1**.

S1(mg/ml)	% Viabilidad	D.E.
0	100	2
1	100	5
2,5	98	5
5	97	6
10	96	10

Sólo se detectó fluorescencia en las células de la levadura β -Gal^{oe} con una gran actividad β -gal. En estas condiciones, el porcentaje de internalización en β -Gal^{oe}, i.e., % de células teñidas con el colorante Rodamina B es del 85% con un S.E. del 5% ($p < 0.01$) para 5 mg/ml de **S1**.

levadura	Actividad β -Galactosidasa (unidades enzimáticas)	D.E.
WT	2,0000	1,0000
β -Galoe	32,0000	2,0000

Ejemplo 6. Experimentos de liberación de carga en células humanas**5 Cultivo celular**

Los reactivos para el cultivo de tejido se obtuvieron de GIBCO/Invitrogen Corporation/Life Technologies Life Sciences. Fibroblastos dermales de dos pacientes con Diskeratosi congénita ligada al sexo (X-DC) (X-DC1774 y X-DC4646) y fibroblastos control con elevado número de pases (DC1787) se obtuvieron de Coriell Cell Repository. Los fibroblastos X-DC1774 y X-DC4646 pertenecen a varones con mutaciones c.109_11delCTT, c.385A>T y c.5C>T *DKC1* respectivamente. Los fibroblastos control DC1787 pertenecen a una mujer portadora de la mutación c.109_11delCTT *DKC1*. Las células H460 (células no pequeñas células de cáncer de pulmón expresando telomerasa) se obtuvieron de ATCC y se mantuvieron en RMPM suplementado con 10% serum fetal bovino (FBS) y las células humanas primarias se mantuvieron en MEM (*Minimum Essential Medium*, GIBCO) suplementado con 15% FBS a 37°C y 5% de CO₂. El medio de cultivo se suplementó con gentamicina (56 µg/ml y L-glutamina (2mM).

Análisis de senescencia por microscopía fluorescente *in vivo*.

Fibroblastos control y X-DC (1*10⁴ células) se colocaron en 6 placas de pocillos y se fijaron después de 4 días para ensayar la actividad de la β-galactosidasa SA-β-gal (Senescence Detection Kit, BioVision, USA). La localización de la liberación de carga de las nanopartículas se visualizó por microscopía fluorescente. Con este fin, las células se cultivaron en cámaras de microscopía ibiTreat (ibidi) de ocho pocillos con placas de 1µ y se trataron con las partículas mesoporosas **S1**. La fluorescencia se visualizó mediante microscopía *in vivo* durante 48 h en un Microscope Observer Z1. La adquisición y procesamiento de la imagen se realizó de la siguiente manera: tipo, apertura numérica y magnificación de las lentes de objetivo: Plan APOCHROMAT de Zeiss 20x, Temperatura 37°C y 5% CO₂. Cámara: Cascade 1k. Software de adquisición: Axiovision 4.8.

El porcentaje de células senescentes (azules) se calculó en las imágenes por microscopía de campo claro (bright field microscopy) a 100x de magnificación (Nikon Eclipse TS100 Microscopy, USA). Se obtuvieron los siguientes valores:

Tabla 2. % de células senescentes.

35

Células	% células senescentes
DC1787	35,5
X-DC1774	55,0
X-DC4646	65,00
H460	0,3

Ensayos de viabilidad celular

La viabilidad de H460 y DC1787 en presencia de **S1** se determinó usando un método de tinte de cristal violeta. Las células se cultivaron en placas de 24 pocillos, tratadas con diferentes cantidades de nanopartículas de sílice mesoporosa y 48 h después del tratamiento, se fijaron con 1% glutaraldehído, se lavaron con PBS y las células restantes se tiñeron con 0,1% cristal violeta. El ensayo de colorimetría usando 595 nm Elisa se utilizó para estimar el número de células por pocillo. Los experimentos se repitieron 3 veces por cuadruplicado.

45

Los ensayos mostraron que las nanopartículas de la invención no son tóxicas en células humanas y en levaduras (fig. 5 B).

Ejemplo 7. Experimento control

50

Para comprobar que la falta de tinción de Rodamina-B en las células H460 no era un artefacto, se prepararon nanopartículas cargadas con Rodamina-B y recubiertas por almidón hidrolizado (**S2**). Estas nanopartículas son similares a las **S1** pero contienen un oligosacárido capaz de hidrolizarse por amilasa en los lisosomas. Las nanopartículas S2 se sintetizaron siguiendo un procedimiento similar al descrito, usando sílice mesoporosa como soporte, Rodamina B como carga y almidón hidrolizado (Glucidex® 47) como recubierta.

55

Cuando se utilizó **S2** en los estudios de internalización bajo condiciones similares a las descritas anteriormente, se detectó una clara tinción en todas las líneas celulares utilizadas, indicando que la liberación en S1 era claramente dependiente a la presencia de β -galactosidasa.

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Nanodispositivo para la liberación controlada de sustancias que comprende un soporte recubierto por oligosacáridos, donde dichos oligosacáridos comprenden al menos 3 unidades de monosacáridos, y donde al menos uno de los monosacáridos es galactosa.
- 2.- El nanodispositivos según la reivindicación anterior que comprende de 3 a 10 unidades de monosacáridos.
- 10 3.- El nanodispositivo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde el oligosacárido comprende de 3 a 6 unidades de monosacáridos.
- 4.- El nanodispositivos según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde al menos un 50% de los monosacáridos son galactosa, preferiblemente todos los monosacáridos son galactosa.
- 15 5.- El nanodispositivo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizado porque tiene un diámetro de 10 nm a 250 nm, preferiblemente de 25 nm a 150 nm.
- 6.- El nanodispositivo cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde el soporte es un material mesoporoso, preferiblemente sílice mesoporosa.
- 20 7.- El nanodispositivo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde el diámetro de poro del soporte es de 0,5 nm a 10 nm, preferiblemente de 1,5 nm a 3,5 nm.
- 25 8.- El nanodispositivo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que además comprende la sustancia a liberar.
- 9.- El nanodispositivo según la reivindicación anterior donde la sustancia a liberar se selecciona de la lista que comprende indicadores, compuestos para la reactivación de la telomerasa, compuestos citotóxicos y cualquiera de sus mezclas.
- 30 10.- El nanodispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 9 donde la sustancia a liberar se secciona de la lista que comprende el péptido GSE 24-2, el péptido TAT2, cisplatino, oxaliplatino, carboplatin, doxorubicina, camptotecina, etoposido, 5-fluorouracilo, gemcitabina, citosina, arabinosido, 6-mercaptopurina, taxanos, vincristina, vinblastina, adriamicina metotrexato, pemetrexed y cualquiera de sus mezclas.
- 35 11.- El nanodispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10 donde la proporción de la sustancia a liberarse es de 0,01 a 0,50 g por g de soporte.
- 40 12.- Procedimiento de obtención del nanodispositivo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende las etapas de:
 - a) funcionalizar el oligosacáridos con un grupo silano,
 - 45 b) suspender el soporte en una disolución de la sustancia a liberar,
 - c) añadir a la suspensión anterior un exceso del oligosacárido funcionalizado de la etapa (a).
- 50 13.- Procedimiento de obtención según la reivindicación anterior donde la etapa (b) se deja en agitación de 1 a 48 horas, preferiblemente de 10 a 30 horas.
- 14.- Procedimiento de obtención según cualquiera de las reivindicaciones de 14 a 15 donde la etapa (b) se lleva a cabo en un disolvente seleccionado de la lista que comprende metanol, etanol, propanol, isopropanol, acetona y acetonitrilo, preferiblemente etanol.
- 55 15.- Procedimiento de obtención según cualquiera de las reivindicaciones de 12 a 14 donde la proporción de oligosacárido funcionalizado / soporte es de 1 a 5 veces en masa.
- 60 16.- Procedimiento de obtención según cualquiera de las reivindicaciones de 12 a 15 donde la etapa (c) se deja en agitación de 0,5 a 20 horas, preferiblemente de 1 a 10 horas.
- 17.- Composición que comprende nanodispositivos según las reivindicaciones 1 a 11.

- 18.- La composición según la reivindicación anterior, donde dicha composición es farmacéutica.
- 5 19.- La composición según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 18 que además comprende excipientes farmacéuticamente aceptables.
- 20.- La composición según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19, donde dicha composición está en forma de comprimido, cápsula, polvo, gránulo, solución, supositorio o jarabe.
- 10 21.- La composición según la reivindicación 17, donde dicha composición es cosmética.
- 22.- La composición según la reivindicación anterior, donde dicha composición está en forma de crema, loción, gel o polvo.
- 15 23.- Uso del nanodispositivo según las reivindicaciones 1 a 11, para la elaboración de un medicamento.
- 24.- Uso del nanodispositivo según las reivindicaciones de 1 a 11 para la elaboración de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades que cursen con la sobreexpresión de β -galactosidasa.
- 20 25.- Uso según la reivindicación anterior, donde la sobreexpresión de β -galactosidasa tiene lugar en células senescentes.
- 25 26.- Uso según cualquiera de las reivindicaciones 24 a 25 donde la enfermedad se selecciona de la lista que comprende el síndrome Wiedemann-Rautenstrauch de progeria neonatal, el síndrome Werner de progeria adulta, el síndrome Hutchinson-Gilford, el síndrome Rothmund Thompson, el síndrome Mulvill-Smith, el síndrome de Cockayne, la Diskeratosis Congénita, la fibrosis pulmonar idiopática, la anemia aplásica, el enfisema, la diabetes tipo 2 y la degeneración de cartílagos.
- 30 27.- Uso del nanodispositivo según las reivindicaciones 1 a 11 para la fabricación de una composición cosmética.
- 28.- Uso del nanodispositivo según las reivindicaciones 1 a 11 para la detección y cuantificación de células senescentes.
- 35

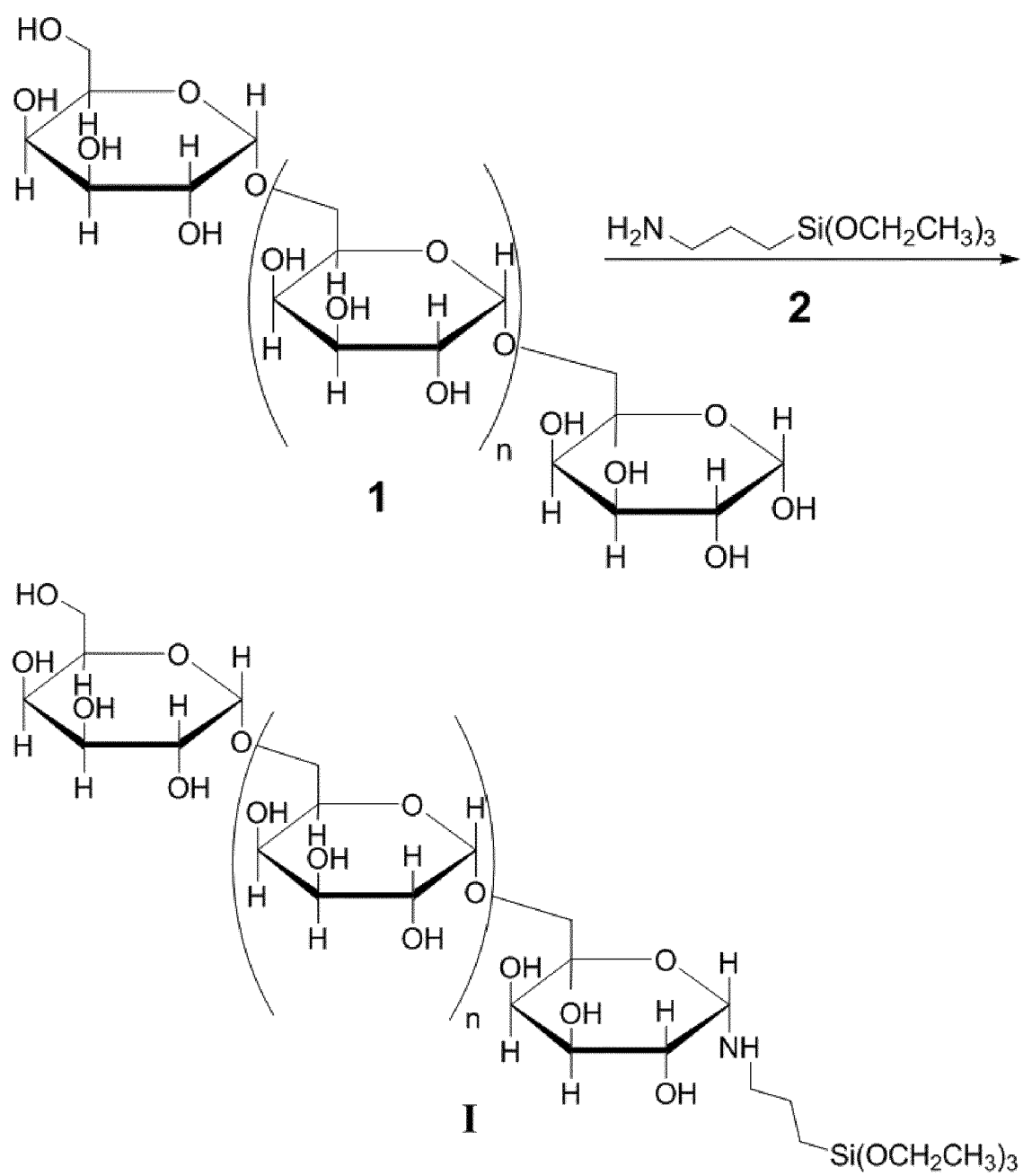
FIG. 1

FIG. 2

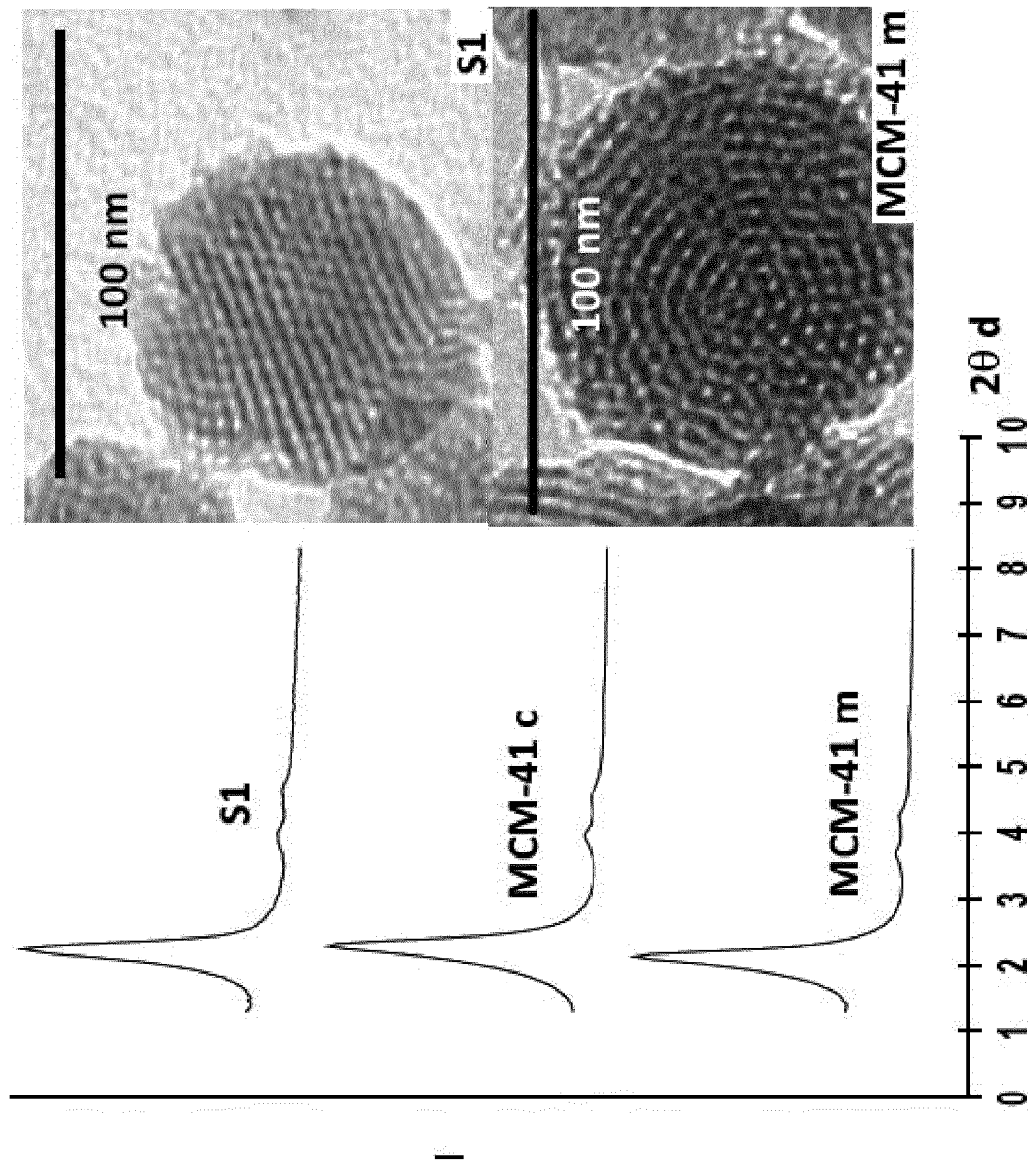


FIG. 3

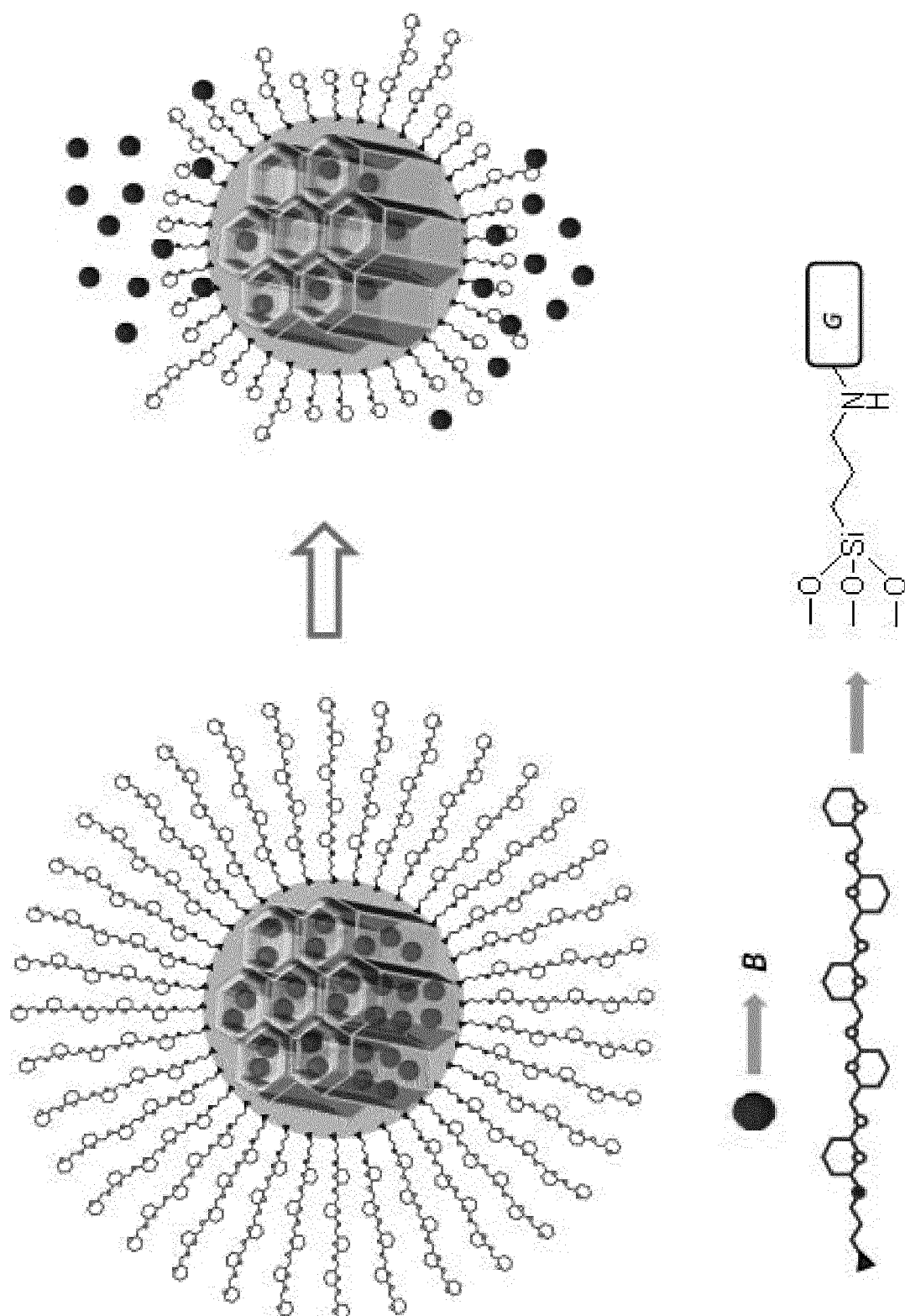


FIG. 4

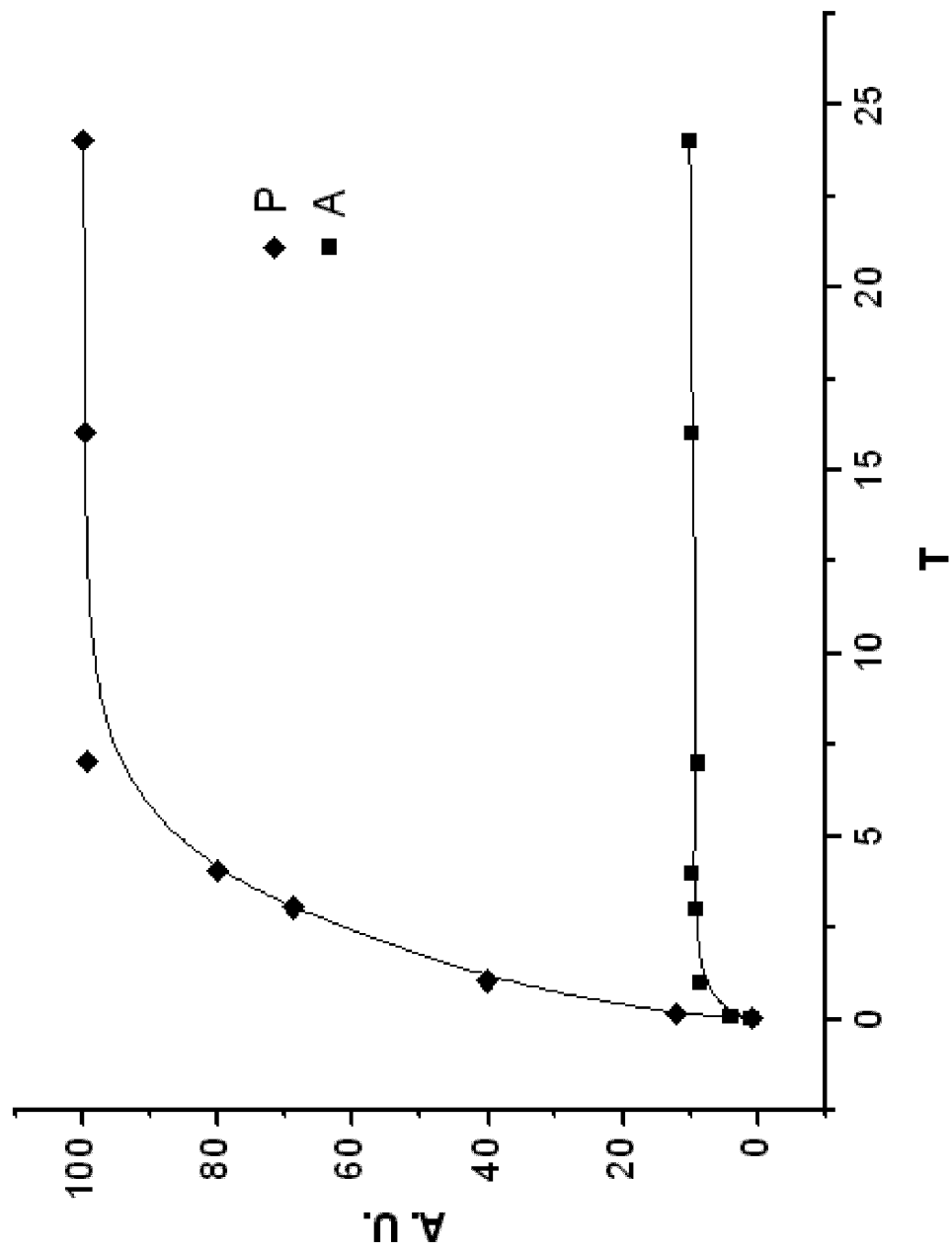
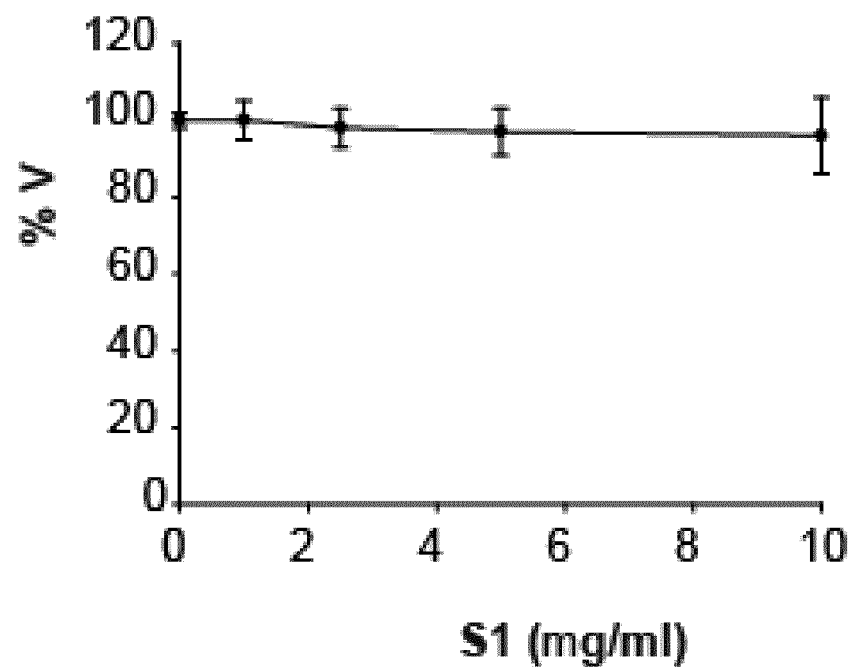


FIG. 5**A****B**